

TABLE DES MATIÈRES

TABLE DES MATIÈRES	I
LISTE DES TABLEAUX	II
LISTE DES FIGURES	III
LISTE DES SIGLES ET DES ABREVIATIONS	IV
I - INTRODUCTION	1
II - MATÉRIELS ET METHODES	4
A.PARTIE CHIMIQUE	4
1. Préparation de l'extrait	4
2.Criblage phytochimique	5
B.PARTIE PHARMACOLOGIQUE	7
1.Animaux d'expérimentation	7
2.Etude de l'effet de l'extrait MH26 sur la diarrhée sécrétoire.....	7
3.Etude de l'effet de l'extrait MH26 sur la motilité intestinale	8
C.EXPRESSION ET ANALYSES DES RÉSULTATS	9
III - RÉSULTATS	10
A.PARTIE CHIMIQUE	10
B.PARTIE PHARMACOLOGIQUE	11
1.Effet de l'extrait MH26 sur la diarrhée sécrétoire	11
2.Activité de l'extrait MH26 sur la motilité intestinale	11
IV - DISCUSSION	14
V - CONCLUSION	16
V - BIBLIOGRAPHIE	17

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I : Les tests et réactifs utilisés pour identifier les différentes familles chimiques présentes dans l'extrait MH26.....	6
Tableau II : Composition de la solution de Tyrode.....	8
Tableau III : Les différentes familles chimiques présentes dans l'extrait MH26.....	10

LISTE DES FIGURES

Figure 1. Distillateur utilisé pour évaporer le filtrat.....	4
Figure 2. Préparation de l'extrait hydroalcoolique MH26.....	5
Figure 3. Variation du volume du fluide intestinal chez le lot témoin et les animaux traités avec l'extrait MH26, administré par voie orale, aux doses de 300 et 600 mg/kg.....	11
Figure 4. Relâchement de l'iléon isolé de cobaye contracté avec l'acétylcholine en présence de l'extrait MH26 injecté dans le bain d'une manière cumulative.....	12
Figure 5. Pourcentage de la contraction de l'iléon isolé de cobaye provoquée par l'acétylcholine en absence et en présence de l'extrait MH26 à 0,125, 0,25 et 0,5 mg/ml dans le bain.....	13

LISTE DES SIGLES ET ABREVIATIONS

α : alpha

β : bêta

< : inférieur

% : pourcentage

Ach : Acétylcholine

°C : degré Celsius

CaCl₂ : chlorure de calcium

CE50 : concentration donnant 50 % d'effet

cm : centimètre

coll : collaborateurs

EDSM : Enquête Démographique et de Santé de Madagascar

e.s.m : écart type standard moyen

FeCl₃ : chlorure de fer (III)

g : gramme

h : heure

HCl : acide chlorhydrique

H₂SO₄ : acide sulfurique

KCl : chlorure de potassium

kg : kilogramme

log : logarithme décimal

MgCl₂ : chlorure de magnésium

mg/kg : milligramme par kilogramme

ml/kg : millilitre par kilogramme

ml : millilitre

mM : millimole

mn : minute

M : mole

mM.l⁻¹ : millimole par litre

\bar{m} : moyenne

n : nombre d'animaux utilisés

NaCl : chlorure de sodium

NaHCO₃ : bicarbonate de sodium

NaH₂PO₄ : phosphate monosodique

NaOH : hydroxyde de sodium

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

P : probabilité

UV : ultra-violet

INTRODUCTION

I - INTRODUCTION

La diarrhée est une des maladies préoccupantes pour la santé publique, surtout dans les pays en voie de développement (BALAJI G. et coll., 2012), avec une mortalité de plus de 4 millions par an (MOHAMMED M.S. et coll., 2014). Ces décès sont dus à l'insalubrité des aliments et de l'eau (HARI J.R. et LAKSHMI., 2012). Selon l'EDSM en 2009, à Madagascar le taux de prévalence de cette maladie chez les enfants de moins de cinq ans est de 8 % (INSTAT et ICF Macro., 2010).

La diarrhée est due au déséquilibre entre l'absorption et la sécrétion intestinale d'eau et d'électrolytes, cela peut être due à la baisse de la réabsorption d'eau, ou à la hausse de la sécrétion d'eau et d'électrolytes (CEZARD J. P. et coll., 2002 ; OMS., 2006). Elle peut être classée en trois types : la diarrhée motrice, la diarrhée osmotique et la diarrhée sécrétoire. La diarrhée motrice est provoquée par une augmentation du péristaltisme intestinal, elle est d'origine nerveuse ; elle peut être causée par le stress ou l'anxiété qui stimule le système parasympathique, libérant de l'acétylcholine (GUE M. et coll., 1997).

Tandis que la diarrhée osmotique est le résultat d'une augmentation de la sécrétion d'eau vers la lumière intestinale suite à la présence de substances osmotiquement actives, non absorbables dans la lumière intestinale. Ces produits ne traversent pas la paroi intestinale et attirent l'eau ou se lient avec l'eau dans la lumière intestinale entraînant un stockage de quantité importante d'eau à l'intérieur de l'intestin. Le sulfate de Magnésium ($MgSO_4$) ou les glucides non résorbés font partie de ces molécules osmotiquement actives (SCHMELZER M., 2011). Par exemple, en cas de carence en lactase, le lactose n'est pas hydrolysé en glucose et galactose qui sont absorbés par la muqueuse intestinale. Dans ce cas, une quantité importante de lactose stagne dans la lumière intestinale et y attirent l'eau, ce qui entraîne la diarrhée lors de l'indigestion de lait (MARTEAU A. et MARTEAU P. H., 2005).

Enfin, la diarrhée sécrétoire est due à la l'irritation de la muqueuse intestinale, provoquant un dysfonctionnement du transport d'ions à travers la membrane des cellules épithéliales intestinales, et augmente le volume du fluide intestinal. Comme dans le cas d'une infection par les bactéries comme *Echerichia coli*, *Salmonella*, *Shigella sp.*, *Campylobacter*, *Vibrio cholerae*, *Clostridium difficile*, *Staphylocoques*, *Klebsiella*, *Aeromonas spp.* (LAKSHMINARAYANA M., 2011); les parasites comme *Giardia lamblia*, *Giardia intestinal*, *Entamoeba histolytica*, *Cryptosporidium sp.*, *Cyclospora sp.*, *Dientamoeba fragilis* (SAURABH A. et coll., 2008), les virus comme les rotavirus, les nosovirus (SCHMELZER M., 2011) et les champignons comme *Candida albicans* (MOHAMMED M. et coll., 2014). Une fois arrivés au niveau de l'intestin, ces agents pathogènes

provoquent directement une lésion au niveau de la paroi, ou ils secrètent des toxines qui altèrent la structure de la paroi intestinale. La destruction de la paroi intestinale entrave sa propriété semi-perméable et perturbe les échanges osmotiques au niveau de la lumière intestinale. L'eau et les électrolytes ne sont plus réabsorbés, à l'origine de l'excrétion de selles molles ou liquides (SCHMELZER M., 2011). A part les agents pathogènes, la diarrhée sécrétoire peut aussi être causée par les produits irritants comme l'huile de ricin qui provoque des réactions inflammatoires diminuant l'absorption de l'eau et des électrolytes et accélérant la motilité intestinale (AMNON H.V. et coll., 1974). Elle peut être également due à l'enzyme enképhalinase intestinale qui dégrade les enképhalines endogènes. Or ces dernières sont responsables de la réabsorption d'eau et d'électrolytes au niveau de la paroi intestinale, et leur absence entraîne l'accumulation d'eau et d'électrolytes dans la lumière intestinale (BOUHNİK Y., 2008 ; BELAICHE J., 2000).

Les différentes drogues utilisées lors d'une diarrhée visent à réduire le nombre d'émissions de selles et à augmenter leur consistance, soit en ralentissant le péristaltisme intestinal, soit en diminuant l'hypersécrétion intestinale. Suivant l'étiologie de la diarrhée, on peut prendre des ralentisseurs du transit intestinal, des agents protecteurs de la muqueuse intestinale, ou des anti sécrétoires. Dans le cas de diarrhées infectieuses, on prescrit des antibactériens (CARRE D. et coll., 2001).

Les antipéristaltiques intestinaux inhibent l'action de l'Acétylcholine, de l'histamine ou de la sérotonine, et ralentissent le transit intestinal. Cela permet à l'intestin de mieux absorber l'eau et les électrolytes, diminue ainsi le volume de selles émises et augmente en même temps leur consistance (ALLAIN P., 2000), comme la loperamide (IMMODIUM®) qui se lie aux récepteurs des opiacés pour ralentir le péristaltisme et augmenter le temps de transit intestinal. Elle élève aussi la résorption d'eau et d'électrolytes au niveau de la lumière intestinale (KENT A. J. et BANKS M. R., 2010).

Afin de diminuer la sécrétion hydro-électrolytique au niveau de l'intestin, des agents mucoprotecteurs sont prescrits. Ces produits ne sont pas absorbés, mais tapissent la muqueuse digestive pour la protéger ; ils sont prescrits contre les agents irritants. Par exemple, le Diosmectite (Smecta®) qui contient des silicates et silicones (PERLMUTER L. et PERLMUTER G., 2013).

Enfin les antisécrétoires agissent également en inhibant l'enképhalinase intestinale qui possède une action antisécrétoire pure sans effet sur la motilité intestinale (PERLMUTER L. et PERLMUTER G., 2013). Ils augmentent le taux d'enképhaline en inhibant l'enképhalinase dans la muqueuse intestinale diminuant ainsi l'hypersécrétion hydro-électrolytique (CTZARD J.P. et coll., 2007). Par exemple, le Racécadotril (Tiorfan®) qui est un inhibiteur de l'enképhalinase.

Par contre, dans le cas de diarrhée d'origine microbienne, les antibactériens comme les SULFAMIDES sont prescrits. Ils empêchent la synthèse de l'acide folique, substance nécessaire au métabolisme des bactéries, et diminuent ainsi leur prolifération (PERLMUTER L. et PERLMUTER G., 2013).

En parallèle à la médecine moderne et à la disponibilité de médicaments pharmaceutiques, les plantes médicinales occupent encore une place importante dans la culture de chaque pays, surtout en Afrique (POUSSET J., 2013). Environ 80% de la population mondiale utilisent encore la médecine traditionnelle et les plantes médicinales (SANOGO R., 2006). A Madagascar, plusieurs plantes sont utilisées pour traiter la diarrhée, comme *Acalypha reticulata* (EUPHORBIACEAE), *Agelaea pentagyna* (CONNARACEAE), *Ageratum conizoides* (ASTERACEAE) et *Annona muricata* (ANNONACEAE). La prise, par voie orale, d'un décocté préparé à partir de 10 à 20 grammes de tige feuillée d'une de ces plantes dans un litre d'eau dans la journée est recommandée (NICOLAS J. P., 2012).

D'après les enquêtes ethnobotaniques que nous avons effectuées à Andasibe et dans la région d'Analamanga, le décocté des feuilles de la plante dont l'extrait est codé MH26, est utilisé contre la diarrhée, l'asthme, l'insomnie et l'inflammation. Ceci nous a incités à étudier son activité sur la diarrhée expérimentale chez le cobaye. Des tests *in vivo* ont été effectués pour étudier son effet sur la sécrétion intestinale, tandis que son mécanisme d'action a été étudié avec des tests *in vitro* sur iléon isolé de cobaye. Enfin, un criblage phytochimique a été effectué pour déterminer les différentes familles chimiques présentes dans l'extrait afin de savoir les responsables éventuels de son activité.

MATERIELS ET METHODES

II - MATÉRIELS ET METHODES

A - PARTIE CHIMIQUE

1 - Préparation de l'extrait

La plante utilisée dans cette étude a été récoltée au mois de Novembre 2016 dans la région d'Analamanga. Les tiges feuillées avec les inflorescences ont été séchées à l'ombre à la température ambiante, pendant 15 jours. Une fois séchées, elles ont été broyées à l'aide d'un broyeur à marteau (BROOK Crompton ©) au Laboratoire de Pharmacologie Générale, de Pharmacocinétique et de Cosmétologie (LPGPC), à la Faculté des Sciences, Université d'Antananarivo.

Deux cent grammes de cette poudre ont été macérés dans un mélange éthanol-eau (60 : 40), à la température ambiante pendant 4 jours. Le macérât a ensuite été filtré sur du coton hydrophile et le filtrat ainsi obtenu a été évaporé à l'aide d'un distillateur (Figure 1), à la température de 80°C, puis dans un bain marie, à la température de 100°C (Figure 2). L'extrait obtenu a été codé MH26, puis pesé pour calculer le rendement de l'extraction selon la formule:

$$\text{Rendement (\%)} = \frac{\text{masse de l'extrait}}{\text{masse de la poudre}} \times 100$$

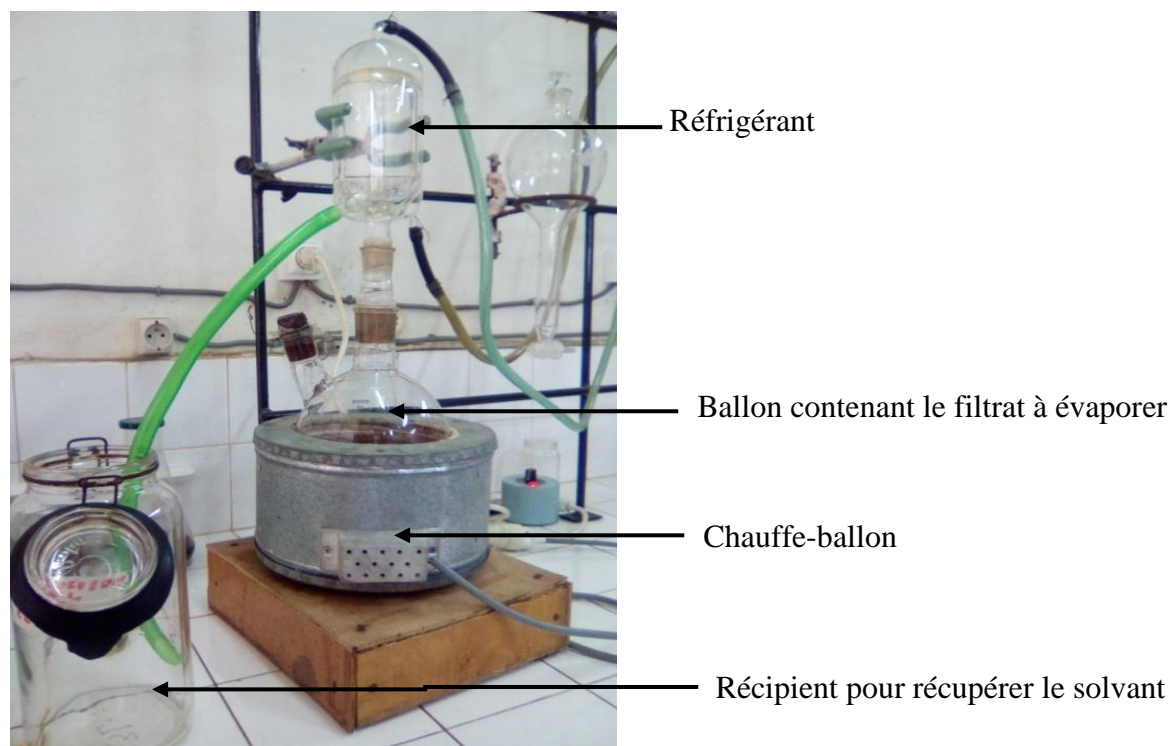


Figure 1. Distillateur utilisé pour évaporer le filtrat.

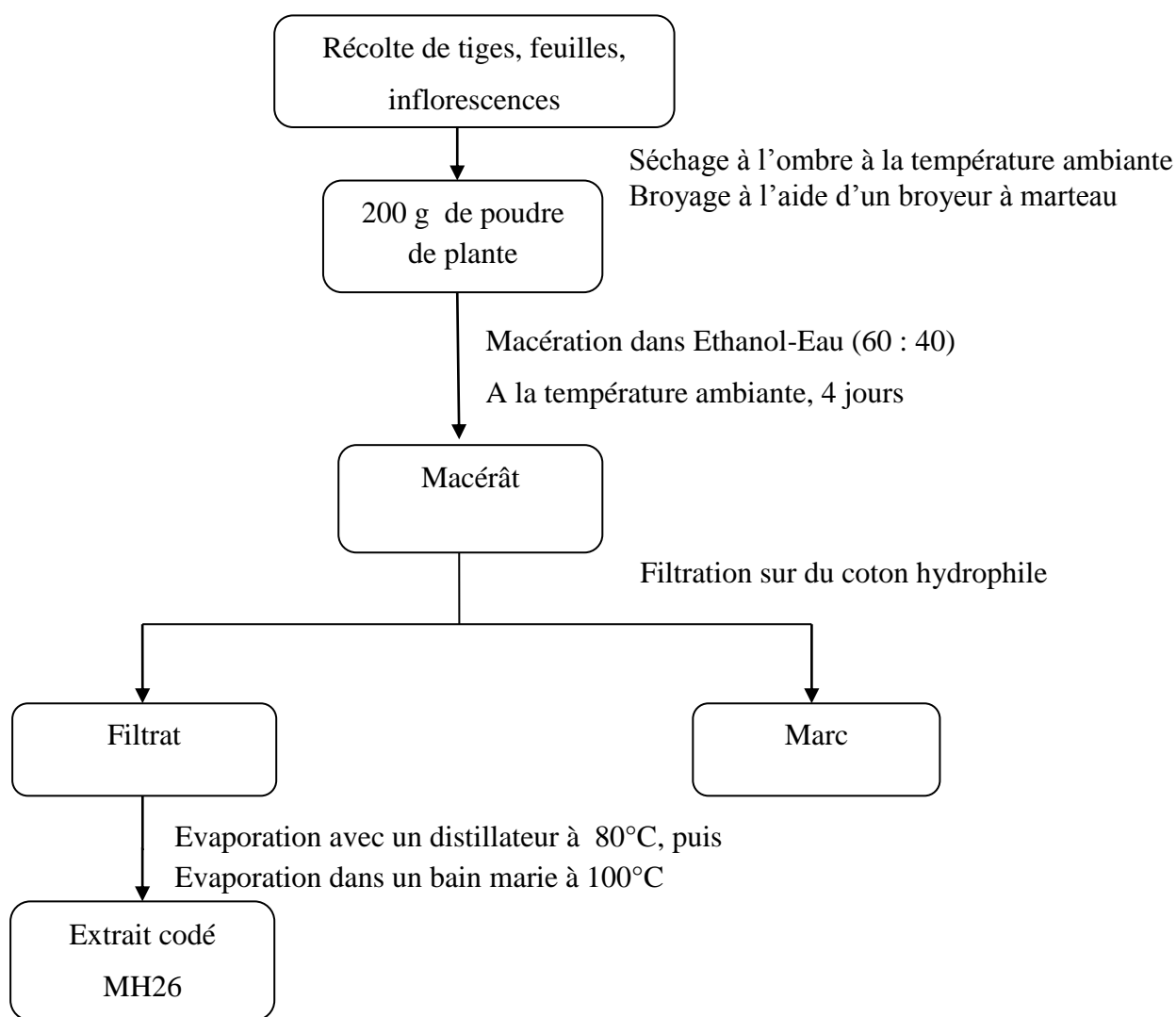


Figure 2. Préparation de l'extrait hydroalcoolique MH26

2 - Criblage phytochimique

Afin d'identifier les différentes familles chimiques présentes dans l'extrait, un criblage phytochimique a été effectué. Ce test est basé sur des réactions de coloration ou de précipitation, en utilisant des réactifs spécifiques pour chaque famille chimique (FONG H.H.S. et coll., 1977) (Tableau I).

Afin de quantifier la proportion des différentes familles présentes dans l'extrait, les signes suivants ont été utilisés :

+++ : Présence en forte teneur

++ : Présence en teneur moyenne

+ : Présence en faible teneur

Tableau I. Tests utilisés pour identifier les différentes familles chimiques présentes dans l'extrait MH26 (FONG H. H. S. et coll., 1977).

Familles chimiques	Tests	Réactifs	Observations
ALCALOÏDES		DRAGENDORFF, MAYER, WAGNER	Précipitation
TANINS		Gélatine + NaCl	Précipitation verte
		Gélatine + FeCl ₃ Méthanol	Précipitation Bleue
COMPOSÉS PHÉNOLIQUES		Gélatine 1%	Précipitation
STÉROÏDES ET TRITERPÈNES	LIERMAN BURCHARD	Anhydride acétique + H ₂ SO ₄	Coloration violette
	BADGET KEDDE	Acide picrique	Coloration rouge
	SALKOWSKI	H ₂ SO ₄	Anneau de séparation rouge
FLAVONOÏDES	WIL-STATER	Ruban de Mg + HCl concentré	Coloration rouge
LEUCOANTHOCYANES	BATH-SMITH	HCl concentré + bain marie	Coloration rouge violacée
ANTHOCYANES		HCl à froid	Coloration rouge
POLYSACCHARIDES		+ 3 volumes d'éthanol	Trouble
SUCRES RÉDUCTEURS		Liqueur de Fehling + Bain-marie	Précipitation rouge brique
COUMARINES		NaOH 10%	Fluorescence à l'UV
SAPONINES	MOUSSE	HCl + agitation	Persistance d'une mousse (3 cm d'épaisseur après 30 mn).

B - PARTIE PHARMACOLOGIQUE

Des tests *in vivo* et *in vitro* ont été effectués chez le cobaye pour étudier l'activité de l'extrait MH26. Son effet sur la diarrhée sécrétoire a été étudié *in vivo* par la méthode d'« *enteropooling* » provoqué par l'huile de ricin, tandis que son effet sur la motilité intestinale et son mécanisme d'action ont été étudiés *in vitro* avec l'iléon isolé de cobaye contracté avec l'acétylcholine en absence et en présence de l'extrait.

1 - Animaux d'expérimentation

Des cobayes mâles et femelles, âgés de 3 à 4 mois, pesant entre 200 et 300 g ont été utilisés. Ils ont été élevés à l'animalerie du Laboratoire de Pharmacologie Générale, Pharmacocinétique et de Cosmétologie (LPGPC) de la Faculté des Sciences, Université d'Antananarivo, avec un cycle de lumière et d'obscurité de 12/12 heures et à la température de 25°C. Ils ont été nourris avec des feuilles de graminées et ont eu un accès libre à de l'eau. Ces animaux ont été mis à jeun pendant 18 heures avant les tests, mais ils ont eu accès libre à de l'eau. Lors des tests *in vivo*, ils ont été répartis en trois lots : un lot témoin et deux lots traités avec MH26.

2 - Etude de l'effet de l'extrait MH26 sur la diarrhée sécrétoire

L'effet de l'extrait contre la diarrhée sécrétoire a été étudié par sa capacité d'inhiber l'accumulation du fluide intestinal ou « *enteropooling* » provoquée par l'huile de ricin (DOHERTY N. S, 1981).

Les animaux du lot témoin ont reçu 10 ml/kg d'eau distillée (BAKARE et coll., 2011) tandis que ceux des 2 autres lots ont reçu l'extrait MH26 aux doses respectives de 300 et 600 mg/kg. L'extrait a été dissout dans de l'eau distillée avant d'être administré par voie orale dans un volume de 10 ml/kg (MITHUM S. et coll., 2011).

Quarante-cinq minutes après, 1 ml d'huile de ricin pure a été administré par voie orale chez tous les animaux des différents lots (AKUODOR G. C. et coll., 2011).

Trente minutes après l'administration de l'huile de ricin, les animaux ont été sacrifiés et une laparotomie a été pratiquée. Deux ligatures ont été effectuées au niveau de l'intestin de ces animaux, la première au niveau du pylore et la deuxième, au niveau de la jonction iléo-caecale. L'intestin entre ces deux nœuds a été prélevé, et son contenu a ensuite été versé dans un récipient gradué afin de mesurer son volume (MAMINILAINORO L., 1996).

La variation du volume du liquide intestinal a été calculée selon la formule :

$$E = \frac{(V_o - V_t)}{V_o} \times 100$$

E : Effet de l'extrait sur la variation du volume de liquide intestinal (%)

V_t : volume du liquide intestinal dans le lot témoin (en ml)

V_o : volume du liquide intestinal dans le lot traité (en ml)

Une valeur de E < 0 indique un effet anti sécrétoire de l'extrait.

3 - Etude de l'effet de l'extrait MH26 sur la motilité intestinale

Pour étudier l'activité de l'extrait MH26 sur la motilité intestinale, son effet sur la contraction de l'iléon isolé de cobaye provoquée par l'acétylcholine a été étudié *in vitro* (HAMMAD H. M. et ABDALLAH S. S., 1997).

a - Préparation et montage de l'organe

L'animal a été mis à jeun pendant 18 heures avant la manipulation, puis sacrifié. Une laparotomie a été pratiquée et l'iléon situé juste avant le gros intestin a été prélevé et coupé en segments de 2 cm, placés dans une boîte de pétri contenant une solution de Tyrode maintenue à la température de 37° C et aéré avec de l'air (PRASHANT B. et coll., 2012) à l'aide d'un aérateur électrique KOKO-108® (Tableau II).

Tableau II. Composition de la solution de Tyrode (TYRODE M., 1910).

Ingrédients	NaCl	KCl	CaCl ₂	NaHCO ₃	MgCl ₂	NaHPO ₄	Glucose
Concentration (mM. l ⁻¹)	136	3,4	3,4	17	1,7	0,8	17

L'organe a été nettoyé en le débarrassant des mésentères. Puis il a été monté dans une cuve à organe isolé contenant 20 ml de solution de Tyrode, maintenue à la température de 37° C et aérée avec de l'air. A l'aide d'un fil de coton inextensible, une des deux extrémités de l'organe a été fixé au fond de la cuve et l'autre extrémité a été fixée à un capteur isométrique (Statham Gould®) sous une tension de 1,5 g (EZIKE A.C. et coll., 2014).

L'organe a été laissé se stabiliser pendant 45 minutes dans le bain. Pendant cette période, le bain a été renouvelé toutes les 15 minutes. Après la stabilisation, la viabilité de l'organe a été testée avec

de l'acétylcholine à la concentration de 10^{-5} M dans le bain. Après ce test, l'organe a été rincé et laissé se stabiliser de nouveau.

b - Etude de l'effet de MH26 sur la contraction provoquée par l'acétylcholine

L'acétylcholine a été injectée dans le bain de façon cumulative à l'aide d'une micropipette pour obtenir des concentrations croissantes à partir de 10^{-9} M dans le bain jusqu'à l'obtention de la contraction maximale. Au plateau de contraction, l'extrait MH26 a été injecté dans le bain d'une manière cumulative, à partir de 0,125 mg/ml jusqu'au relâchement total de l'organe. Après cette manipulation, l'organe a été rincé 2 fois et laissé de nouveau se stabiliser.

c - Etude du mécanisme d'action de MH26 vis-à-vis de l'acétylcholine

Pour étudier le mécanisme d'action de MH26, son effet vis-à-vis de l'acétylcholine a été étudié. Après la période de stabilisation et de sensibilisation, l'organe a été incubé dans le bain contenant l'extrait aux concentrations respectives de 0,125, 0,25 et 0,5 mg/ml dans le bain pendant 15 minutes. Ensuite, l'acétylcholine a été injectée dans le bain de façon cumulative afin d'obtenir des concentrations croissantes à partir de 10^{-9} M jusqu'à l'obtention de la contraction maximale de l'organe. Au plateau de la contraction, l'organe a été rincé, puis laissé se stabiliser de nouveau pendant 45 minutes en rinçant toutes les 15 minutes.

Un capteur isométrique Statham Gould couplé à un ordinateur avec comme interface le logiciel Signal Monitor enregistre les signaux correspondant à la contraction et au relâchement de l'organe. Ensuite l'amplitude des contractions a été mesurée et rapportée sur une échelle semi logarithmique, en fonction de la concentration de l'acétylcholine ou de l'extrait dans le bain. Puis, les CE_{50} de l'acétylcholine et de l'extrait ont été déterminées graphiquement.

C - EXPRESSION ET ANALYSES DES RÉSULTATS

Les résultats ont été exprimés sous forme de moyenne avec écart type ($\bar{m} \pm e.s.m.$), puis elles ont été comparées entre elles en utilisant le test « t » de Student. Une valeur de $P < 0,05$ a été considérée comme significative.

RÉSULTATS

III - RÉSULTATS

A - PARTIE CHIMIQUE

La macération de 200 g de poudre de plante dans un mélange éthanol : eau (60/40) donne 54 g d'extrait MH26 soit un rendement de 27 %.

Les résultats du criblage phytochimique effectué sur l'extrait MH26 révèlent la présence de polysaccharides et de tanins en forte teneur, de sucres réducteurs en moyenne teneur et d'anthocyanes, stéroïdes et terpènes en faible teneur (Tableau II).

Tableau III. Les différentes familles chimiques présentes dans l'extrait de plante MH26

FAMILLES CHIMIQUES	TENEUR
Polysaccharides	+++
Tanins	+++
Sucres réducteurs	++
Anthocyanes	+
Stéroïdes et terpènes	+

+++ : Présence en forte teneur

++ : Présence en teneur moyenne

+: Présence en faible teneur

B - PARTIE PHARMACOLOGIQUE

1 - Effet de l'extrait MH26 sur la diarrhée sécrétoire

L'administration de l'huile de ricin par voie orale chez le cobaye provoque une accumulation de fluide dans la lumière intestinale des animaux. Administré par voie orale, MH26 diminue cette accumulation du fluide. Cet effet varie en fonction de la dose administrée. Chez les cobayes du lot témoin, le volume du liquide intestinal est de $1,6 \pm 0,17$ ml contre $0,53 \pm 0,04$ et $0,08 \pm 0,03$ ml respectivement chez les animaux traités avec l'extrait MH26 aux doses de 300 et 600 mg/kg ($P < 0,05$) (Figure 3).

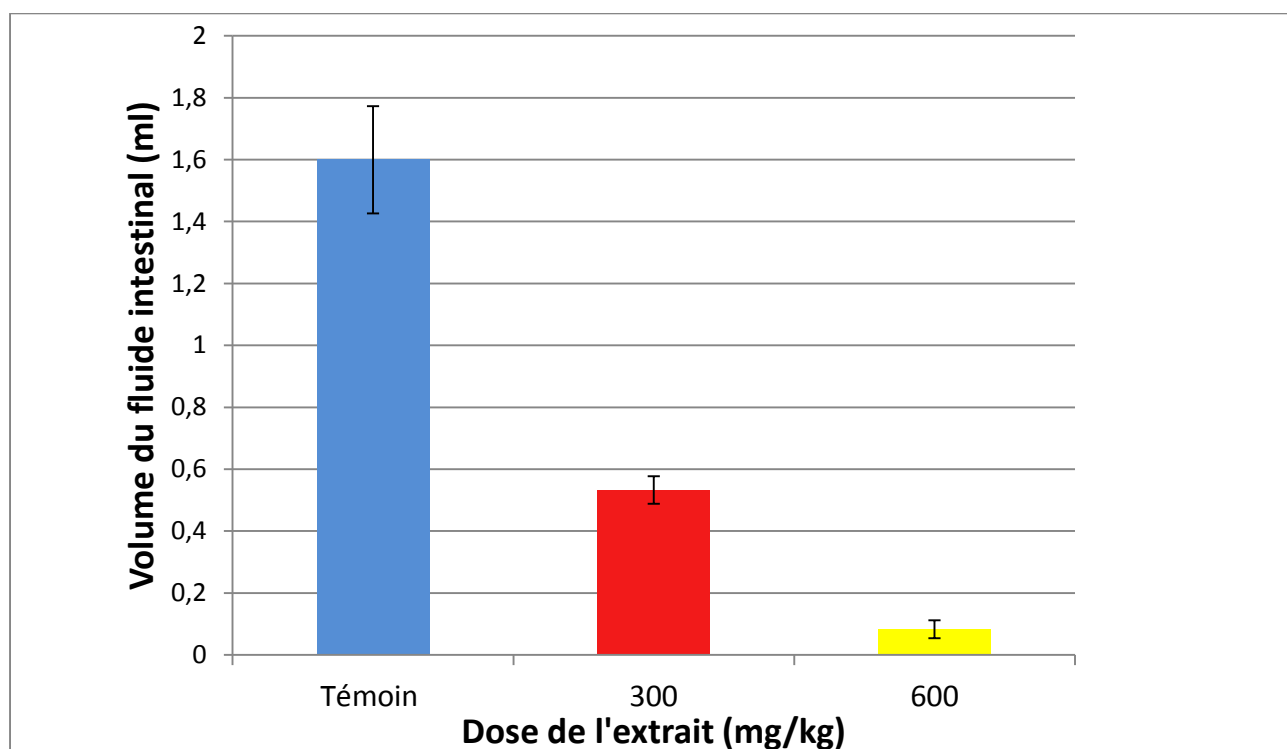


Figure 3. Variation du volume du fluide intestinal chez le lot témoin et les animaux traités avec l'extrait MH26, administré par voie orale, aux doses de 300 et 600 mg / kg ($\bar{m} \pm e.s.m$; $n = 3$; $P < 0,05$).

2 - Activité de l'extrait MH26 sur la motilité intestinale

a - Effet de l'extrait MH26 sur la contraction provoquée par l'acétylcholine

L'extrait MH26 relâche l'iléon isolé de cochon d'Inde contracté avec l'Acétylcholine. A la concentration de 0,125 mg/ml dans le bain, l'extrait MH26 provoque un relâchement de $32,5 \pm 3 \%$, et un relâchement total avec la concentration 0,5 mg/ml ($P < 0,05$) (Figure 4).

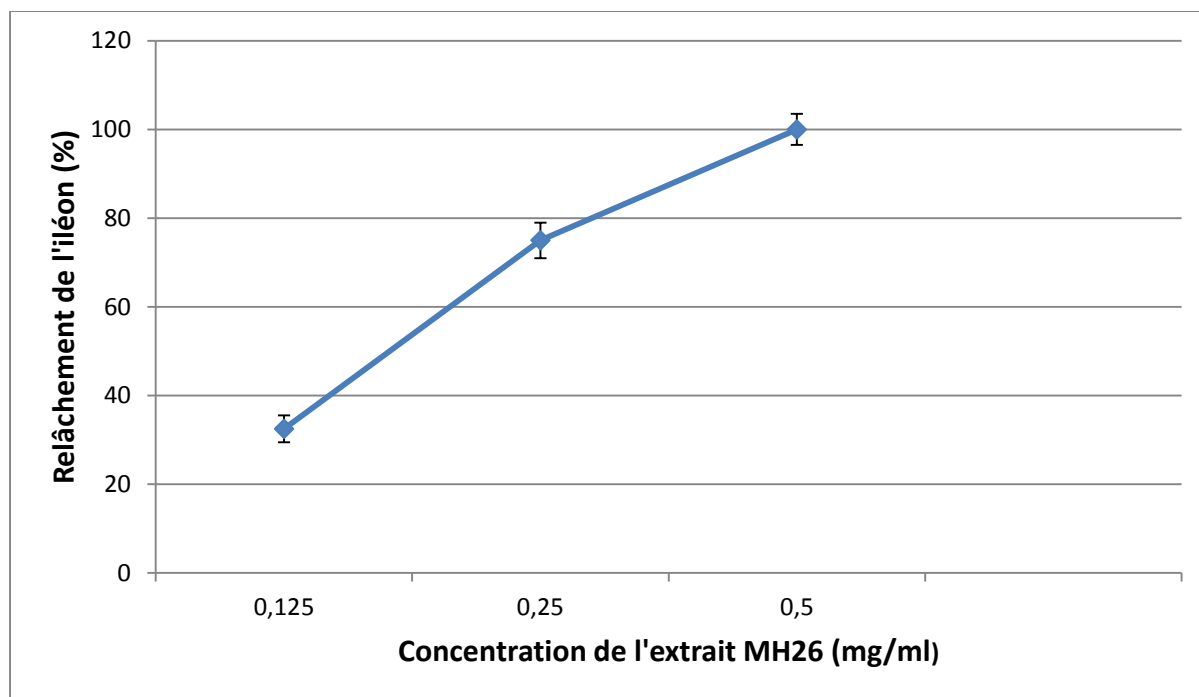


Figure 4. Relâchement de l'iléon isolé de cobaye contracté avec l'acétylcholine en présence de l'extrait MH26 injecté dans le bain d'une manière cumulative ($\bar{m} \pm \text{e.s.m}$, $n = 3$, $P < 0,05$).

b - Mécanisme d'action de MH26 vis-à-vis de l'acétylcholine

L'acétylcholine injectée dans le bain contracte l'iléon isolé de cobaye, et l'amplitude de la contraction augmente en fonction de sa concentration dans le bain; l'amplitude de la contraction maximale de 100% est obtenue à la concentration d'acétylcholine dans le bain égale à 10^{-4} M. Sa CE_{50} est égale à $3,37 \cdot 10^{-6}$ M. En pré-incubant l'iléon dans le bain contenant l'extrait, l'amplitude maximale de la contraction provoquée par l'acétylcholine diminue et sa CE_{50} augmente. En présence de l'extrait aux concentrations respectives de 0,125, 0,25 et 0,5 mg/ml dans le bain, l'effet maximal est déprimé à $62 \pm 3,22$ %, $50 \pm 1,2$ % et $42 \pm 7,2$ % ($P < 0,05$), et la CE_{50} augmente à $1,07 \cdot 10^{-5}$ M, $1,73 \cdot 10^{-5}$ M et $1,95 \cdot 10^{-5}$ M, ($P < 0,05$) (Figure 5).

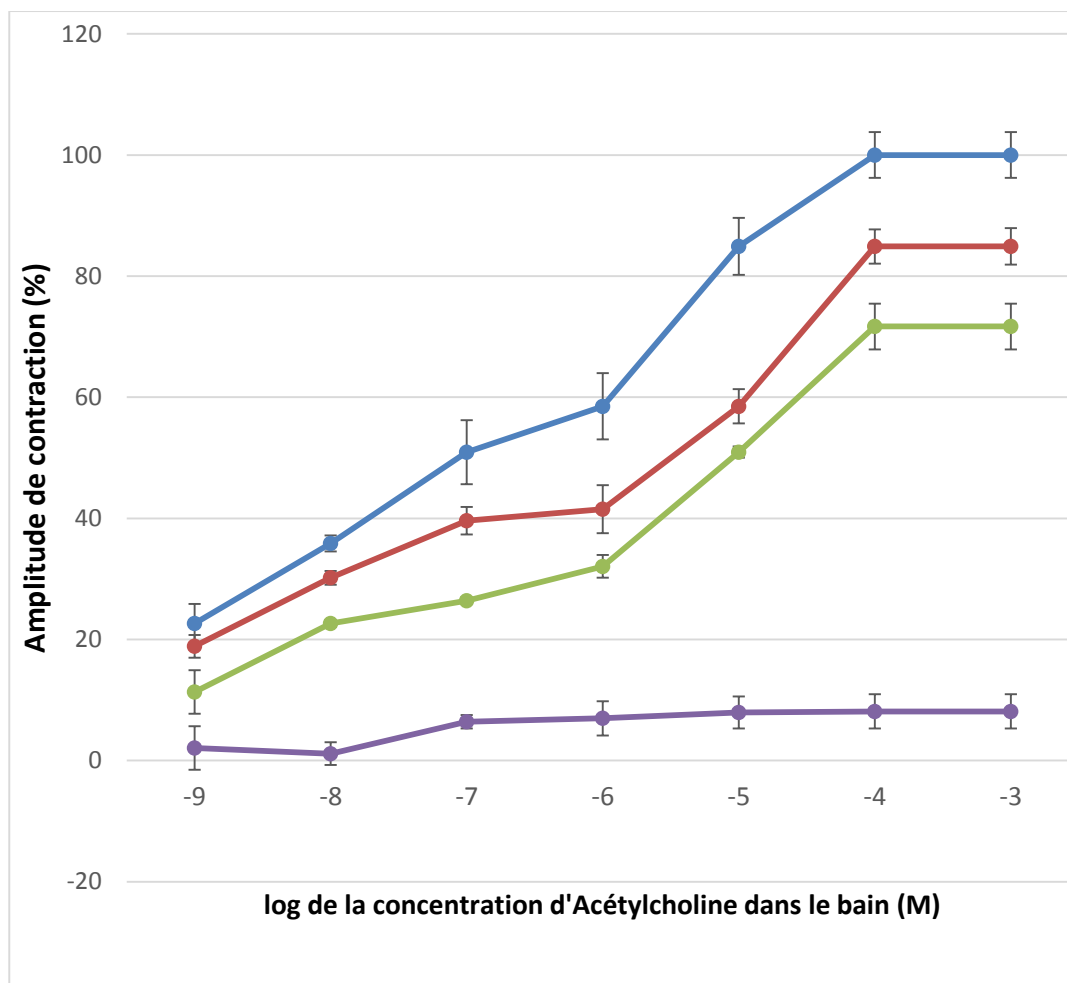


Figure 5. Pourcentage de la contraction de l'iléon isolé de cobaye provoquée par l'acétylcholine en absence ● et en présence de l'extrait MH26 à 0,125 ● , 0,25 ● et 0,5 mg/ml ● dans le bain

($\bar{m} \pm \text{e.s.m}$, n = 3, P < 0,05).

DISCUSSION

IV - DISCUSSION

Notre objectif a été d'étudier l'activité de l'extrait MH26, une plante utilisée dans la médecine traditionnelle contre la diarrhée. Cette étude a été effectuée chez le cobaye. Son effet sur la diarrhée sécrétoire a été étudié *in vivo* provoquée par l'administration d'huile de ricin par voie orale. Pour étudier son mécanisme, son effet sur la contraction de l'iléon isolé de cobaye provoquée par l'acétylcholine a été étudié *in vitro*.

L'huile de ricin pure, administrée par voie orale irrite la muqueuse intestinale (SARANGI. R. R. et coll., 2011 ; UKWANI A. N. et coll., 2012), et provoque ainsi une sécrétion accrue de liquide et d'électrolytes dans la lumière intestinale, aboutissant à l'augmentation du volume du fluide intestinal, à l'origine de la diarrhée sécrétoire (GALVEZ J. et coll., 1993 ; EKE G. I., 2014). Les résultats des tests *in vivo* montrent que l'extrait diminue l'accumulation de fluides dans la lumière intestinale provoquée par cette huile. Cette diminution est fonction de la dose de l'extrait MH26 administrée. Ce qui nous permet d'avancer que l'extrait MH26 diminue l'hypersécrétion hydro électrolytique provoquée par l'huile de ricin.

Trois mécanismes peuvent être proposés pour expliquer cet effet: soit l'extrait diminue la sécrétion d'eau et d'électrolytes dans la lumière intestinale suite à l'inflammation provoquée par l'huile de ricin, soit il protège la paroi intestinale contre l'irritation provoquée par l'huile de ricin, enfin il pourrait aussi fermer les pores responsables de la sécrétion d'eau et d'électrolytes au niveau de la paroi intestinale ou augmenter l'absorption d'électrolytes et de l'eau.

Les travaux effectués sur l'extrait d'*Indigofera pulchra* (FABACEAE) montrent qu'il possède une activité anti-sécrétoire, et que cette activité est due aux tanins. En effet, les tanins réagissent avec les protéines de la muqueuse intestinale et donnent des tannates qui la protègent et la rendent imperméable à l'eau, ce qui diminue la sortie d'eau et l'accumulation du fluide dans la lumière intestinale (MOHAMMED A. et coll., 2009). Les résultats du criblage phytochimique effectué sur l'extrait MH26 a révélé la présence de tanins en forte teneur. Nous pouvons avancer une hypothèse que la diminution du volume de fluide dans la lumière intestinale des animaux traités avec l'extrait pourrait être due à la présence des tanins dans l'extrait. En précipitant les protéines au niveau de la paroi intestinale, ils fermentaient les pores, diminuant ainsi la sécrétion d'eau et d'électrolytes, ceci protégerait aussi la paroi intestinale contre l'action irritante de l'huile de ricin, ce qui expliquerait la baisse du volume de fluide accumulé dans la lumière intestinale chez les animaux traités avec l'extrait.

Par ailleurs, la baisse de l'accumulation d'eau dans la lumière intestinale peut être due à l'augmentation de sa réabsorption. Cette dernière pourrait être due à la réabsorption d'eau secondaire à la réabsorption de sodium ou de chlore sous l'action de l'enképhaline intestinale (BELAICHE J., 2000), ou au ralentissement du mouvement péristaltique intestinal qui augmente le temps de contact entre l'intestin et son contenu, permettant à l'intestin de mieux réabsorber l'eau et diminue ainsi l'accumulation de l'eau dans la lumière intestinale (DANGOUMAU J. et coll., 2006). Dans le premier cas, l'extrait pourrait inhiber l'action de l'enképhalinase comme *Andansonia digitata* (BOMBACACEAE) (KENNE F. O., 1994) et *Indigofera pulchra* (FABACEAE) (MOHAMMED A. et coll., 2009).

Les résultats des tests *in vitro* montrent que l'extrait MH26 relâche l'iléon isolé contracté avec de l'acétylcholine. De plus, après l'incubation de l'iléon avec l'extrait MH26, l'effet maximal de l'acétylcholine diminue et la valeur de sa CE_{50} augmente. Cette diminution est de type non compétitif. C'est-à-dire qu'il se fixe sur des récepteurs autres que le récepteur muscarinique (RAJAMANICKA M. et coll., 2010). Cela peut être une stimulation du récepteur β -adrénergique qui relâche le muscle lisse intestinal ou le récepteur α -adrénergique qui inhibe la motilité gastro-intestinale. Il se peut aussi que cet effet pourrait être due à la présence de tanins qui, du fait de leur propriété astringente, empêche l'acétylcholine de se fixer sur ses récepteurs muscariniques et diminue la contraction du tractus gastro-intestinal (MOHAMMED A. et coll., 2009). Cette diminution de la motilité intestinale augmente la durée du transit intestinal, laissant à l'organisme le temps d'absorber l'eau, ce qui aboutirait à la formation de selles plus consistantes et à l'arrêt de la diarrhée (JOHN G. et QUADRA I., 2003 ; KENT A. J. et BANKS M. R., 2010).

De nombreuses plantes comme *Carum copticum* (APIACEAE) (BALAJI G. et coll., 2012), *Vitex doniana* (VERBENACEAE) (UKWANI A. N. et coll., 2012) et *Andansonia digitata* (BOMBACACEAE) (KENNE F. O., 1994) contenant ce composé ont des propriétés anti-motilité puisque les tanins diminuent l'excitabilité des fibres musculaires lisses intestinales (HAVAGIRAY R. et coll., 2004).

Etant donné que l'extrait MH26 n'était pas encore pur, il est encore difficile de définir le ou les principes actifs de l'extrait et son mécanisme d'action exact.

CONCLUSION

V - CONCLUSION

Les résultats que nous avons obtenus montrent que l'extrait MH26 inhibe la motilité intestinale et diminue l'accumulation de fluide dans la lumière intestinale. Ces effets diminuent la fréquence d'émissions de selles et augmentent la consistance de celles-ci. Ces résultats nous permettent de conclure que l'extrait MH26 possède une activité anti-diarrhéique. Cette activité pourrait être attribuée à la présence des tanins dans l'extrait.

BIBLIOGRAPHIE

V - BIBLIOGRAPHIE

ALLAIN P. (2000).

Les médicaments.

Ed. CdM , (France), 50 - 54.

AKUODOR G. C., MUAZZAM I., USMAN-IDRIS M., MEGWAS U. A., AKPANJ L., CHILAKA K. C., OKOROAFOR D. O., OSUNKWO U. A. (2011).

Evaluation of the Antidiarrheal activity of methanol leaf Extract of *Bombax Buonopozense* in rats.

Ibnosina J. Med. Biomed. Sci., 3(1):15 – 20.

AMNON H.V., THOMAS P.J., PHILLIPS S. (1974).

Effects of the oleic acid and recinoleic acid on net jejuna water and electrolyte movement.

J. Clin. Invest., 53: 374 – 379.

BAKARE R. I., MAGBAGBEOLA O. A., AKINWANDE A. I., OKUNOWO O.W., GREEN M. (2011).

Antidiarrheal activity of aqueous leaf extract of *Momordica charantia* in rats.

J. Pharmacognosy Phytother., 3(1): 1 - 7.

BALAJI G., CHALAMAIAH M., R AMESH B., AMARNATH R. Y. (2012).

Antidiarrhoeal activity of ethanol and aqueous extracts of *Carum opticum* seeds in experimental rats.

Asian. Pac. J. Trop. Biomed., 1151 - 1155.

BELAICHE J. (2000).

Physiopathology of acute infectious diarrhea.

Acta Endoscopica., 30 (3): 177 - 184.

BOUHNİK Y., XAVIER T. (2008).

Diarrhée, malabsorption.

Revue du Praticien., 18 - 32.

CARRE D., COTON T., DELPY R., GUISSET M., DEBONNE J. M. (2001).

Diarrhées aiguës infectieuses : traitement actuel et perspectives.

Rev. Gen. Med. Trop., **61**(6): 521 - 528.

CEZARD J. P., CHOURAQUI J. P., GIRARDET J. P., GOTTRAND F., BENHAMOU P. H., BOIGE N., FAURE C., GINIES J. L., LENEARTS C., MAHERZI, MORALI A., MOUGENOT J. F., MOUTERDE O., OLIVES J. P., SARLES J., SCAILLON M., TURCK D. (2002).

Traitement médicamenteux des diarrhées aiguës infectieuses du nourrisson et de l'enfant.

Rev. Gen. Med. Trop., **61**(6): 521 - 528.

CTZARD J. P., BELLAICHE M., VIALA J., HUGOT J. P. (2007).

Traitement médicamenteux des diarrhées aiguës du nourrisson et de l'enfant.

Arch. Pediatr., **14**: 169 - 174.

DANGOUMAU J., MOORE N., MOLIMARD M., FOURRIER-REGLAT A., LATRY K., HARAMBURU F., MIREMONT-SALAME G., TITIER K. (2006).

Pharmacologie générale.

Ed. Université Victor Segalen (Bordeaux 2), 171 - 175.

DOHERTY N.S. (1981).

Inhibition of arachidonic acid release as the mechanism by which glucocorticoids inhibit endotoxin-induced diarrhoea.

Br. J. Pharmacol., **73**: 549 - 554.

EKE G. I., ANAGA O. A. (2014).

Evaluation of anti-diarrheic properties of the aqueous methanolic extract of *Palisota hirsuta* leaves and its fractions using in vivo models.

Afr. J. Pharm. Pharmacol., **8**(12): 327 - 332.

EZIKE A.C., AKAH P.A., OKOLI C.O., UFERE I.K., EZEUDU E., OKOYOE C.F., ASHARAC., IGOKWEN I.N. (2014).

Studies on gastrointestinal effects of *Desmodium velutimum*: a traditional remedy for diarrhea.

Am. J. Pharmacol. Toxicol., **9** (2): 114 - 124.

FONG H.H.S, TIN-WA M., FARNSWORTH N.R. (1977).

Phytochemical screening.

Rev. College of Pharmacy, University of Illinois Chicago (USA), 275 - 277.

GALVEZ J., ZAZRZUELO A., CRESPO M.E., LORENTE M.D., OCETTE M.A., JIMENEZ J. (1993).

Antidiarrhoeic activity of *Euphorbia hirta* extract and isolation of an active flavonoid constituent.

Planta Medica., **59**: 333 - 336.

GUE M., RIO-LACHEZE C., EUTAMENE H., THEODOROU V., FIORAMONTI J., BUENO L. (1997).

Stress-induced visceral hypersensitivity to rectal distension in rats: role of CRF and mast cells.

Neurogastroenterol. Motil., **9** : 271 - 279.

HAMMAD H.M., ABDALLAH S.S. (1997).

Pharmacological effects of selected flavonoids on rat isolated ileum : structure-activity relationship.

J. Pharmacol., **28** (5): 767 - 771.

HARI J. R., LAKSHMI. (2012).

Anti-Diarrhoeal Activity of the Aqueous Extract of the Bark of *Cinnamomum Zeylanicum* Linn in Mice.

J. Clin. Diagn. Res., **6**(2): 215 - 219.

HAVAGIRAY R., RMAESH C., SADHNA K. (2004).

“Study of antidiarrhoeal activity of *Calotropis gigantea* in experimental animals”.

J. Pharmacol. Pharmaceut. Sci., **7**: 70 - 75.

INSTAT et ICF Macro. (2010).

Enquête Démographique et de Santé de Madagascar (EDSM) 2008-2009 (MADAGASCAR et USA), 156 - 164.

JOHN G., QUADRA I. (2003).

Le traitement de la diarrhée.

Pediatr. Child Health, **8** (7): 463 - 466.

KENNE FOPA O. (1994).

Contribution à l'étude de l'activité antidiarrhéique de la pulpe de fruit d'*Adansonia digitata* L (BOMBACACEAE).

Thèse de doctorat en pharmacie. Faculté de Médecine et de Pharmacie. Université CHEIKH ANTA DIOP (DAKAR): 48 - 72.

KENT A. J., BANKS M. R. (2010).

Pharmacological management of diarrhea.

Gastroenterol. Clin. North. Am., **3** (39): 495 - 507.

LAKSHMINARAYANA M., SHIVKUMAR H., RIBAMEN P., BHARGAVA V.K. (2011).

Antidiarrheal activity of leaf extract of *Moringa oleifera* on experimentally induced diarrhea in rats. *Int. J. Phytomed.*, **3**: 68 - 74.

MAMILAINORO L. (1996).

Etude de l'activité antidiarrhéique des extraits bruts de la plante D2.

Mémoire de DEA en Pharmacologie.

Faculté des Sciences, Université d'Antananarivo, 14 - 20.

MARTEAU A., MARTEAU P.H. (2005).

Entre intolérance au lactose et maldigestion.

Cah. Nutr. Diet., **40** (1): 1S121 - 1S123.

MITHUM S. R., VEENA N., AKANSHA C., HITESHJA W., VIKRAMSIN G. (2011).

Evaluation of Antidiarrheal Activity of Aerial Parts of *Vinca major* in Experimental Animals. *Middle-East J. Sci. Res.*, **7** (5): 784 - 788.

MOHAMMED A., AHMED H., GOJIAD T., OKPANACHI A. O., EZEKIEL I., TANKO Y. (2009).

Preliminary anti-diarrhoeal activity of hydromethanolic extract of aerial part of *Indigofera pulchra* in rodents.

Asian. J. Med Sci., **1**(2): 22 - 25.

MOHAMMED M. S., MOHAMMED M., IBRAHIM H., SHAMSU G., MOHAMMED U. K., PATRICIA I. K. (2014).

Antidiarrhoeal effect of the crude methanol extract of the dried fruit of *Andansonia digitata* L. (MALVACEAE).

Vet. World., **7**(7): 495 - 500.

NICOLAS J. P. (2012).

Plantes médicinales du nord de Madagascar. Ethnobotanique Antakarana et informations scientifiques.

Ed. Jardin du monde (France), Chap. **4** : 13 - 278.

OMS. (2006).

Manuel à l'usage des médecins et autres personnels de santé qualifiés.

Service de Production des Documents de l'OMS, Genève, Suisse, 1 - 52.

PERLEMUTER L., PERLEMUTER G. (2013).

Guide thérapeutique.

Ed. Elsevier, (Paris), 526 - 541.

POUSSET Jean-Lois (2013).

Plantes médicinales d'Afrique. Comment les reconnaître et les utiliser.

Revue « Le monde des plantes » n° 484, 12 - 14.

PRASHANT B. S., SADHANA R. S., SUVARNA T. J. (2012).

Evaluation of antidiarrheal effect of Black pepper (*Piper nigrum* L.).

Asian. J. Plant. Sci. Res., **2** (1): 48 - 53.

RAJAMANICKA M., RAJASEKARAN A., ANANDARAJAGOPAL K., SRIDHARAN D., SELVAKUMAR K., STEPHEN B. R. (2010).

Activité anti-diarrhéique de *Dodonaea viscosa* root extraits v.
Int. J. Pharma. Bio. Sci., **1**(4):182 - 185.

SANOGO R. (2006).

Le rôle de plantes médicinales en médecine traditionnelle.

Développement, Environnement et santé.

Faculté de Médecine et d'Odonto Stomatologie, Université de Bamako, Mali, 1 - 53.

SARANGI R. R., MISHRA U. S., PANDA S. K., BEHERA S. (2011).

Evaluation de l'activité anti-diarrhéique de *Sida rhombi folia linn.* root.
Rech. Int. Rev. Pharm., **2**(9): 157 - 160.

SAURABH A., AMARENDRA P., PRASANTA K. (2008).

Evaluation of antimicrobial activity of some medicinal plants against enteric Bacteria with particular reference to multi-drug resistant *Vibrio cholerae*.
Trop. J. Pharm. Res., **8**(3): 231 - 237.

SCHMELZER M. (2011).

Troubles du tractus gastro-intestinal inférieur.

Société Nationale Française de Gastro-Entérologie (Snfge), France, Ed. Elsevier chap. **57**, 416-493.

TYRODE M. (1910).

The mode of Action of Some Purgative Salts.

Arch. Intern. Pharmacodyn., **17**: 205 - 209.

UKWUANI A. N., SALIHU S., ANYANWU F. C., YANAH Y. M., SAMUEL R. (2012).

Antidiarrhoeal activity of aqueous leaves extract of *Vitex doniana*.
Int. J. Toxicol. Pharmacol. Res., **4**(3):40 - 44.

ÉTUDE DE L'ACTIVITÉ ANTI-DIARRHÉIQUE DE L'EXTRAIT MH26 CHEZ LE COBAYE

Auteur : RAKOTOSOLOFO Kiady Miarozo

Adresse : LOT II H 103 Soavimasandro

Téléphone : 033 72 302 34 / 034 25 954 72

e-mail : r.kiadymiarozo@gmail.com

Année : 2016-2017

Laboratoire : Laboratoire de Pharmacologie Générale, de Pharmacocinétique et de Cosmétologie

B.P : 8351

e-mail : frandimbi@gmail.com

Faculté des Sciences.

Université d'Antananarivo.

RÉSUMÉ

L'objectif de cette étude a été d'évaluer l'activité de l'extrait MH26 sur la diarrhée expérimentale chez le cochon d'Inde. Son activité anti-sécrétoire a été étudiée *in vivo*, par la méthode d'enteropooling provoquée par l'huile de ricin, et son effet anti péristaltique a été étudié *in vitro* sur l'iléon isolé de cobaye contracté avec l'Acétylcholine. Nos résultats montrent que l'extrait MH26 diminue l'enteropooling provoqué par l'huile de ricin. Aux doses de 300 et 600 mg/kg l'enteropooling est respectivement réduit de $0,53 \pm 0,04\%$, à $0,08 \pm 0,03\%$ contre $1,6 \pm 0,17\%$ par rapport au lot témoin ($P < 0,05$). Il inhibe également l'hyper péristaltisme provoqué par l'Acétylcholine. MH26 inhibe d'une manière non compétitive la contraction de l'iléon provoquée par l'Acétylcholine. En présence de l'extrait aux concentrations de 0,125, 0,25 et 0,5 mg/ml dans le bain, l'effet maximal de l'Acétylcholine est respectivement réduit à $62 \pm 3,22\%$, $50 \pm 1,2\%$ et $42 \pm 7,2\%$ ($P < 0,05$) et sa CE_{50} augmente de $1,07.10^{-5} M$ à $1,73.10^{-5} M$ et $1,95.10^{-5} M$. La présence de tanins pourrait être l'origine de cette activité anti-diarrhéique.

Mots-clés : diarrhée, anti-péristaltique, anti-sécrétoire, enteropooling.

ABSTRACT

The aim of this work was to investigate the activity of extract MH26 on experimental diarrhea in guinea pig. The anti-secretory activity of the extract was studied by enteropooling method induced by castor oil while its anti-motility effect was studied *in vitro* on acetylcholine-induced contracted isolated ileum. The results show that extract MH26 reduces enteropooling induced by castor oil and the hyper-motility of contracted ileum induced by acetylcholine. At doses 300 and 600 mg/kg, extract MH26 reduces enteropooling from $1.6 \pm 0.17\%$ for the control group to $0.53 \pm 0.04\%$ and $0.08 \pm 0.03\%$ respectively in the treated groups ($P < 0.05$). *In vitro* tests results show that extract MH26 inhibit the contraction of the isolated ileum provoked by acetylcholine in a non-competitive manner from 10^{-9} to $10^{-3} M$. At concentrations 0.125, 0.25 and 0.5 mg/ml in the bath, extract MH26 reduces motility to $62 \pm 3.22\%$, $50 \pm 1.2\%$ and $42 \pm 7.2\%$ respectively ($P < 0.05$) and increases the EC_{50} to $1.07.10^{-5} M$, $1.73.10^{-5} M$ and $1.95.10^{-5} M$ respectively. The tannins present in extract MH26 could be responsible for this anti-diarrhea activity.

Keywords: diarrhea, antiperistaltic, antisecretory, enteropooling.